

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON CALCIUM
AUF DIE ACETYLCHOLINKONTRAKTUR UND DIE ELEKTRISCHE
ERREGBARKEIT DENERVIERTER RATTENZWERCHFELLE
IN NORMALEM UND DEPOLARISIERENDEM MILIEU.
CALCIUMBESTIMMUNGEN IM RATTENZWERCHFELL

VON

HARTMUT PORZIG

Mann 1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554419_0011



UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON CALCIUM
AUF DIE ACETYLCHOLINKONTRAKTUR UND DIE ELEKTRISCHE
ERREGBARKEIT DENERVIERTER RATTENZWERCHFELLE
IN NORMALEM UND DEPOLARISIERENDEM MILIEU.
CALCIUMBESTIMMUNGEN IM RATTENZWERCHFELL

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
HARTMUT PORZIG
aus Jena/Thür.

MAINZ 1965

Dekan: Professor Dr. G. Korting
Referent: Professor Dr. H. Lüllmann
Korreferent: Professor Dr. G. Kuschinsky
Tag der mündl. Prüfung: 26. November 1965

Gesamtherstellung: Ditters Bürodienst Mainz

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Einleitung	1
Methodik	4
1. Versuche am isolierten, denervierten Rattenzwerchfell ...	4
2. Calciumbestimmungen	5
Ergebnisse	6
A. Ergebnisse der Versuche am isolierten, denervierten Ratten- zwerchfell in normaler Tyrodelösung	6
B. Ergebnisse der Versuche am isolierten, denervierten Ratten- zwerchfell in depolarisierender Tyrodelösung	7
C. Ergebnisse der Calciumbestimmungen	10
(Tabellen)	
Besprechung der Versuchsergebnisse	12
1. Mechanogramme	12
2. Calciumbestimmungen	16
Zusammenfassung	19
Literaturverzeichnis	20

EINLEITUNG

Es ist das Ziel zahlreicher Untersuchungen in den letzten Jahren gewesen, die Vorgänge zu klären, die sich zwischen der Einwirkung von Nervenreizen (Acetylcholinfreisetzung), von chemischen Substanzen sowie von elektrischem Strom auf die Membran der Muskelfaser und der Verkürzung der kontraktilen Elemente abspielen. Zunächst sah man in der Depolarisation das zentrale Ereignis und glaubte, in ihr das Verbindungsglied zwischen Erregung und Kontraktion gefunden zu haben. Denn man konnte mit allen Mitteln, mit denen eine Depolarisation zu erreichen war, gleichzeitig auch eine Verkürzung der Muskelfaser bewirken (43, 44). Verschiedene Beobachtungen, so etwa die einer zeitlichen Dissoziation zwischen der Spitze des Aktionspotentials und dem ersten Anzeichen einer mechanischen Aktivierung des Muskels, mußten aber zu der Annahme eines zusätzlichen Kopplungsfaktors zwischen beiden Erscheinungen führen (Lit. bei 59, 60, 64). Es ist inzwischen sehr wahrscheinlich gemacht worden, daß dieser Faktor mit dem Calcium identisch ist (4, 15, 18, 19, 27, 28, 34, 51, 52, 54, 57, 59, 60, 61, 66, 67). Das gilt sowohl für die glatte Muskulatur wie für den Skelettmuskel und das Herz. Daß Calcium eine wichtige Rolle bei der Muskelkontraktion spielt, wurde allerdings schon früher besonders von Heilbrunn 1940 sowie von Heilbrunn und Wiercinski 1947 vermutet. Diese Untersucher konnten Muskelfasern durch lokale Calciuminjektion mit Mikropipetten zur Verkürzung bringen (siehe auch 52). Calcium ist das einzige physiologische Ion, mit dem das möglich ist (33).

In welcher Art und Weise Calcium in den Ablauf der Reaktionskette, Depolarisation der Membran - Kopplungsmechanismus - Aktivierung der kontraktilen Elemente - Kontraktion, eingreift, wurde mit verschiedenen Methoden untersucht. Uns interessieren hier nur die Befunde zum ersten Glied dieses komplizierten Ablaufs, die an intakten isolierten Muskeln oder Muskelstreifen erhoben werden können. Der zweite Teil, dessen Erörterung uns zu weit führen würde, also besonders die Aktivierung der kontraktilen Elemente unter der Einwirkung von Calcium, der in der Tiefe der Muskulatur abläuft, wird mit anderen Verfahren untersucht (Lit. bei 65).

Es ergab sich bei der Beobachtung des Einflusses von Calcium auf die elektrischen Erscheinungen an der Membran unter anderem, daß Calciummangel allein schon eine gewisse Depolarisation verursacht (8, 9, 16, 36, 61) und die Höhe des Aktionspotentials reduziert (16, 17, 36, 23). Dieser Einfluß auf das Aktionspotential beruht allerdings nach den Untersuchungen von

Koketsu und Noda (42) nur mittelbar auf dem Fehlen von Calciumionen.

Mit Hilfe radioaktiver Calciumisotope lassen sich die Calciumverschiebungen durch die Membran der Muskelzelle unter verschiedenen Bedingungen einigermaßen quantitativ verfolgen. Die Untersuchungen von Woodward (68), Harris (32), Bianchi und Shanes (62, 4), Robertson (57), Bianchi (3), Jenkinson und Nicholls (38) sowie von Winegrad (67) lassen den Schluß zu, daß allen Mitteln, mit denen man eine Kontraktion auslösen kann, die Erhöhung des Calciumstromes in den und aus dem Muskel gemeinsam ist.

Mit einfacheren Versuchsanordnungen läßt sich die "Calciumabhängigkeit" der mechanischen Erscheinungen bei den verschiedenen Arten der Muskelverkürzung untersuchen. Der Skelettmuskel des Kaltblüters sowohl wie der des Säugetiers wird in calciumfreier Lösung elektrisch unerregbar (5, 11, 16, 17, 19, 6). Auch die Kontrakturen, die sich an Kaltblütermuskeln und an den glatten Muskeln der Säugetiere durch Acetylcholin oder Kalium u. a. auslösen lassen, sind nur in Gegenwart von Calciumionen zu sehen (15, 19, 28, 27, 53, 6). Bei beiden Substanzen ist die Kontraktur von einer Membrandepolarisation begleitet, wie sie ja auch eine elektrische Reizung hervorruft. Es lag also nahe anzunehmen, daß Depolarisation eine unbedingte Voraussetzung für die Aktivierung der kontraktilen Elemente darstellt. Dann gelang es aber, an glatten Muskeln von Säugetieren (Rattenuterus, Katzendarm u. a.) nachzuweisen, daß es trotz völliger Depolarisation in einem statt Natriumchlorid Kaliumsulfat enthaltenden Milieu als Antwort auf Acetylcholin und einige andere Substanzen noch zu einer Verkürzung kommen kann (20, 21). Der Acetylcholineffekt wird von Atropin antagonistisch gehemmt. Einen ähnlichen Befund konnten Singh und Acharya (63) am Froschmagen erheben. Diese Kontrakturen des depolarisierten Muskels sind calciumabhängig. In einem calciumfreien Milieu sind sie nach einer je nach Art des Präparates wechselnden Zeitspanne nicht mehr auszulösen. Der Effekt ist reversibel. Kurze Zeit nach der Zugabe von Calcium ist die Kontraktur wieder nachzuweisen (15, 19, 57, 63). Edman und Schild konnten sogar zeigen, daß sich der depolarisierte Rattenuterus in calciumfreiem Milieu allein auf Calciumgaben hin kontrahiert. In normaler calciumfreier Ringerlösung war diese Wirkung nicht zu beobachten. Am Skelettmuskel des Frosches sind ähnliche Untersuchungen von Frank durchgeführt worden. Er sah aber keinerlei Reaktion auf Acetylcholin bei völliger Depolarisation durch Kaliumsulfat- oder Kaliumchloridtyrodelösung.

Es erschien uns wichtig zu untersuchen, inwieweit ähnliche Erscheinungen wie diese bisher erwähnten am Skelettmuskel des Säugers nachzuweisen sind. Unter normalen Bedingungen ist dieser aber nicht in der Lage, auf irgendeinen

Reiz mit einer Kontraktur zu antworten. Nur die Endplatte, als Synapse zwischen Nerv und Muskel, spricht auf Acetylcholin an. Seit den Untersuchungen von Knowlton und Hines (41), Rosenblueth und Luco (58), Reid und Vaughan Williams (56) u.a. (weitere Lit. bei 49) sowie neueren Befunden von Axelsson und Thesleff mit Hilfe der Iontophoresetechnik (1) ist indessen bekannt, daß der chronisch denervierte Skelettmuskel eine erhöhte Empfindlichkeit für Acetylcholin gewinnt. Die ganze Oberfläche des Organs regiert dann auf Acetylcholin wie die Endplatte, die ihre normale Empfindlichkeit behält. Muscholl und Lüllmann konnten dasselbe am isolierten chronisch denervierten Rattenzwerchfell zeigen. Sie wiesen zudem nach, daß die Acetylcholinempfindlichkeit von der Dauer der Denervation abhängig ist und die Kontraktur durch Curare unterdrückt werden kann (50). An solchen denervierten Präparaten sahen Edman und Grieve (18), daß sowohl die Acetylcholinkontraktur wie die elektrische Erregbarkeit, die durch Denervation nicht verloren geht, in calciumfreiem Milieu nach 3-4 Stunden verschwinden. Wird der Muskel in einer Kalium statt Natrium enthaltenden Lösung depolarisiert, so lassen sich, wie bei der glatten Muskulatur, noch Kontrakturen mit Acetylcholin erzeugen, während die elektrische Erregbarkeit erlischt (38, 18).

Unsere eigenen Versuche sind ebenfalls zum Teil diesem Problem gewidmet. Sie sollen die nicht sehr zahlreichen Befunde am Säugetiermuskel ergänzen. Die Calciumbestimmungen sollten Aufschluß geben über den Einfluß der Denervierung auf den Calciumgesamtgehalt des Zwerchfells. Sie sind außerdem als Voraussetzung für radioaktive Fluxmessungen am Säugerskelettmuskel wichtig. Am Zwerchfell der Ratte sind solche Bestimmungen unseres Wissens noch nicht durchgeführt worden. Die rasch ablaufenden Calciumverschiebungen während der Muskelaktivität werden allerdings bei der Messung des Gesamtcalciumgehaltes nicht erfaßt. Denn erstens kompensieren sich der erhöhte Ein- und Ausstrom weitgehend, und zweitens weiß man, besonders durch Untersuchungen am Frochskelettmuskel, daß an diesen Calciumverschiebungen sowieso nur ein Teil des Gesamtcalciums in ionisierter Form teilnehmen kann (30, 32). Nur nach stundenlanger Tetanisation steigt im normalen Muskel der Calciumgehalt etwas an (24, 31, 48).

METHODIK

1. Versuche am isolierten, denervierten Rattenzwerchfell

Operation. Wir verwendeten 180 - 290 g schwere weibliche Albinoratten. Die Zwerchfellhälften wurden nach der von Lüllmann und Muscholl (46) angegebenen Methode denerviert. Dabei wird in Hexobarbitalnarkose (200 mg/kg Ratte intraperitoneal) von einem etwa 10 mm langen, am Hals paramedian gelegenen Hautschnitt aus der rechte Phrenicus an dem Punkt aufgesucht, an dem der Nerv vom Plexus brachialis aus nach caudal zieht und ein möglichst langes Stück (10 - 20 mm) exhärtet. 5 - 31 Tage (meist 11 - 28 Tage) nach der Denervierung wurden die isolierten Zwerchfellhälften in der Anordnung nach Bülbbring (7) untersucht.

Anordnung. Der Muskel wird dazu aus dem durch Genickschlag getöteten und entbluteten Tier zusammen mit einem Stück der anhängenden Brustwand entnommen. Mit diesem wird er an einem geeigneten Kunststoffhalter befestigt. Am Centrum tendineum bringt man, ohne das Muskelparenchym zu verletzen, einen Faden an, über den das Präparat mit einem Schreibhebel zur isotonischen Registrierung verbunden wird. Während der Versuche befindet sich der Muskel in einem etwa 80 ml fassenden Badgefäß. Bei einem Teil der Versuche war die Anordnung so gewählt, daß zwei Badbehälter schwenkbar an einem Halter befestigt waren und bei einem Badwechsel das Organ sofort in das bereits vorbereitete Gefäß getaucht werden konnte. Das jeweils freie Bad wurde mit Aqua dest. gründlich ausgespült, besonders beim Übergang von einer calciumhaltigen zu einer calciumfreien Nährlösung.

Reizung. Die direkte Reizung des Muskels erfolgte über zwei Platinstifte als Elektroden, die beiderseits der Muskelplatte parallel zueinander gelagert waren. Die Stromstöße wurden von einem Rechteckimpulsgenerator geliefert. Die Impulsdauer betrug 0,4 msec bei einer Frequenz von etwa 1 Hz und Maximalreizstärke.

Registrierung. Die Registrierung erfolgte isometrisch über einen Schreibhebel auf ein Rußkymographion.

Nährlösungen. Als Nährlösungen wurden verwendet:

- a. normale Tyrodelösung (Zusammensetzung: NaCl 8,0; KCl 0,2; CaCl₂ 0,2; MgCl₂ 0,1; NaHCO₃ 1,0; NaH₂PO₄ 0,648; Glucose 1,0 g, Aqua dest. ad 1000,0)

- b. calciumfreie Tyrodelösung (Zusammensetzung wie oben ohne Ca)
- c. Kaliummethylsulfattyrodelösung zur Depolarisierung. 8,0 g NaCl wurden dabei durch 21,0 g KCH_3SO_4 ersetzt.
- d. calciumfreie Kaliummethylsulfattyrodelösung (Zusammensetzung wie c. ohne Ca)

Alle Angaben in g/l.

Das Bad wurde mit einer Mischung von 95% O_2 und 5% CO_2 feinblasig durchperlt.

Kaliummethylsulfat stellten wir nach der Vorschrift von E. Mutschler und R. Lindmar (im Addendum zu (45)) her.

2. Bestimmungen des Gesamtcalciums im Rattenzwerchfell

Zur Verwendung kamen 150 - 300 g schwere weibliche Albinoratten, die durch Genickschlag getötet und entblutet wurden. Wir entnahmen dann jeweils das rechte Hemidiaphragma und präparierten es auf Blaubandfilter frei von anhängendem Gewebe. Bei den Versuchen ohne Badvorbehandlung wurden aus der Muskelplatte sofort 3 - 4 etwa 50 mg schwere Stücke gewonnen und in einem standardisierten Verfahren von der dem Muskelgewebe äußerlich anhaftenden Flüssigkeit befreit (90 sec. zwischen zwei Blaubandfiltern). Bei Badvorbehandlung wurde das Präparat in einem dreieckigen Plexiglasrahmen ausgespannt und durchschnittlich drei Stunden in der jeweils angegebenen Badflüssigkeit bei Zimmertemperatur und Durchströmung mit Carbogen aufbewahrt; die anschließende Behandlung entsprach der oben angegebenen. Die so gewonnenen Proben wurden gewogen und feucht verascht. Dazu fügten wir den Proben 0,2 ml (in einer Serie 0,4 ml) eines Säuregemisches zu, das etwa gleiche Teile einer ca. 70%igen Perchlorsäure und rauchender Salpetersäure enthielt, und erhitzen stufenweise (innerhalb etwa 2^h) im Aluminiumblock auf $\sim 360^\circ$. Den Rückstand lösten wir unter Erwärmen auf etwa 80° in 0,5 ml $n/10$ HCl und verdünnten mit 3,0 ml Aqua bidest. bzw. mit 2 ml, wenn nur Ca bestimmt werden sollte. Von diesen 3,5 ml wurde 1 ml entnommen und auf 10 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt. In diesen Proben bestimmten wir flammenphotometrisch Kalium und Natrium (Kipp Flammenphotometer). Von den restlichen 2,5 ml wurden 2 ml zur fluoreszenztitrimetrischen Calciumbestimmung nach Klaus (39) verwendet.

ERGEBNISSE

A. VERSUCHE AM ISOLIERTEN, DENERVierten RATTENZWERCHFELL IN NORMALER TYRODELOSLUNG

Im Versuchsverlauf wurde das Verhalten folgender Größen untersucht:

I. Bei Calciummangel

1. Zuckungsamplitude bei direkter elektrischer Reizung
2. Amplitude der einzelnen Acetylcholin- Kontraktur
3. Die Geschwindigkeit des Rückganges der Einzelkontraktur
4. Abnahme der elektrischen Erregbarkeit
5. Auslösbarkeit der Acetylcholin- Kontraktur

II. Bei anschließender Calciumzugabe

6. Geschwindigkeit der Restitution der elektrischen Erregbarkeit
7. Geschwindigkeit der Restitution der Acetylcholin- Kontraktur

Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn lag jeweils eine Vorperiode von etwa 25 Min., bis sich die Kontraktionsamplitude auf ein gleichmäßiges Niveau eingestellt hatte. Dann wurde die Acetylcholinempfindlichkeit geprüft (gleichzeitig ein Test für die Denervation) und eine Dosis gewählt, bei der die Kontrakturamplitude zwischen 60 und 110% der Amplitude bei direkter elektrischer Reizung lag. Das entsprach bei der Mehrzahl der Versuche einer Dosis von 5×10^{-7} g/ml Bad. Bei einigen benötigten wir 10^{-6} g/ml. Während der Zeit, in der der Muskel sich in calciumfreiem Milieu befand, wurde durchgehend elektrisch gereizt und regelmäßig alle 15 Min. eine Acetylcholin- Kontraktur gleicher Stärke ausgelöst. In der Erholungsphase mußten die Acetylcholin- Dosen häufiger gegeben werden, zunächst im Abstand von drei, dann von fünf Minuten, um den Verlauf der Restitution genauer beurteilen zu können.

Unter Calciummangel wird das Zwerchfell nach 135 - 250 Min. elektrisch unerregbar, nachdem unmittelbar nach Überführung in ein calciumfreies Bad die Amplitude der direkten Reizung noch einmal angestiegen war (siehe auch 5, 10, 18). Wie wir in Kontrollexperimenten feststellen konnten, ist diese Zeit beim nicht chronisch denervierten Muskel etwa gleich lang. In derselben Zeitspanne nahm die Acetylcholin- Kontraktur bei der gewählten Dosis bis auf nicht mehr meßbare Werte ab (Abb. 1). Es ist das aber kein Zeichen der Unfähigkeit des Präparates, auf Acetylcholin mit einer Kontraktur zu antworten. Vielmehr läßt sich mit höheren Dosen (ACh 10^{-4} g/ml) noch über Stunden eine Verkürzung erzielen. Neben der Amplitude geht im calciumfreien Milieu auch die Dauer der ACh- Kontraktur durch einen schnelleren Abfall zurück. Dieser Effekt sieht dem ähnlich, den man an tonischen Froschmuskeln unter Calciummangel beobachtet (Abb. 1).

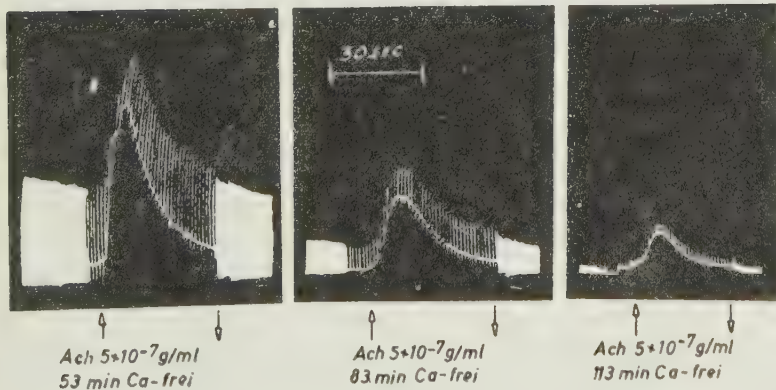
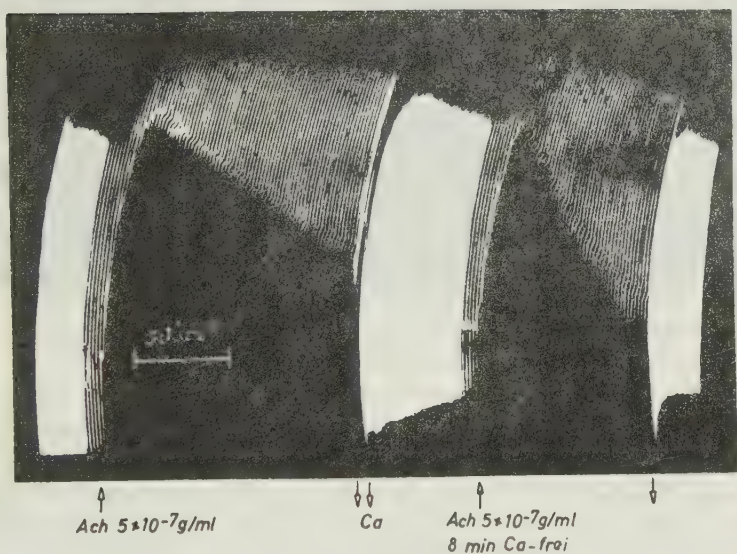


Abb. 1: Wirkung des Ca-Mangels auf die ACh-Kontraktur und die elektrische Erregbarkeit des denervierten Rattenzwerchfells. 14 Tage denerviertes Hemi-diaphragma. Registrierung isotonisch auf Rußkymographion. Umdrehungsgeschwindigkeit des Kymographen im schnellen Gang (jeweils während einem Effekt) 40 mm/min. Reizfrequenz ~ 1 Hz. Maximalreizstärke.

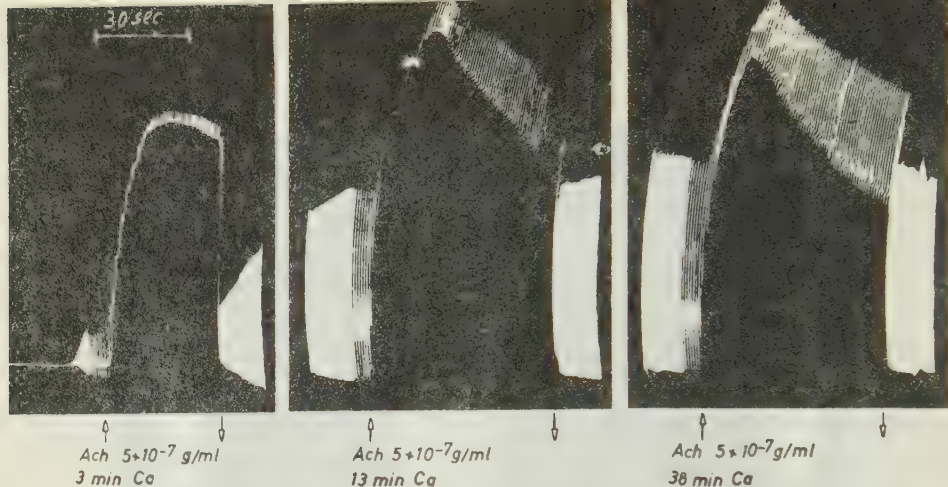


Abb. 2: Verhalten des denervierten Rattenzwerchfells während elektrischer und Acetylcholin-Reizung bei Wechsel von calciumfreier zu calciumhaltiger Badlösung. Der zuvor in calciumfreiem Milieu unerregbar gewordene Muskel spricht nach kurzer Zeit wieder in normaler Weise auf elektrische und ACh-Reizung an. 14 Tage denerviertes Hemidiaphragma. Isotonische Registrierung auf Rußkymographion. Umdrehungsgeschwindigkeit des Kymographen im schnellen Gang während eines Reizeffektes 40 mm/min. Reizfrequenz ≈ 1 Hz, Maximalreizstärke.

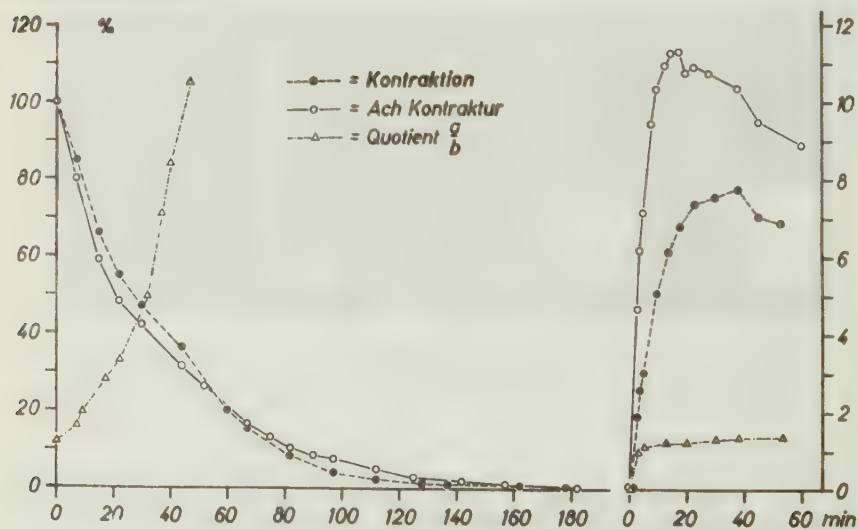


Abb. 3: Die Kurven machen das Verhalten der Kontraktionen auf direkten elektrischen Reiz, der ACh-Kontrakturen des Quotienten a/b (Ordinateneinteilung rechts) bei Aufbewahrung in calciumfreier Nährlösung (linker Teil der Abb.) und anschließendem Wechsel in normale Tyrodelösung (rechter Teil der Abb.) deutlich. Es handelt sich um die Mittelwerte aus allen verwertbaren Versuchen. Die Kurve für die ACh-Kontrakturen fällt bei der von uns gewählten Dosis mit der Kurve für die Kontraktionshöhe zusammen (siehe auch 18).

Weitere charakteristische Unterschiede im Verhalten der elektrisch ausgelösten Kontraktion und der Acetylcholin- Kontraktur ergeben sich, wenn man die Restitution dieser beiden Arten der Muskelverkürzung nach erneuter Calciumzugabe beobachtet. Grundsätzlich erholen sich aber beide in relativ kurzer Zeit, verglichen mit der Zeitspanne, die benötigt wird, um sie durch Calciummangel zu unterdrücken (Abb.2). Die Reaktion auf direkte elektrische Reizung braucht meist etwa 30 Min., um einen im weiteren Verlauf nicht mehr wesentlich ansteigenden Wert von durchschnittlich 70 - 90% der Ausgangsamplitude zu Beginn des Versuchs zu erreichen. Derselbe Wert, also 100%, wurde in keinem Fall wieder gesehen. Das entspricht auch der Beobachtung, daß die Höhe der Amplitude auch ohne jede Änderung der Badzusammensetzung oder anderer Versuchsbedingungen im Laufe von Stunden allmählich abnimmt.

Die Acetylcholin- Kontraktur erholt sich wesentlich rascher. Schon 5 Min. nach Calciumzugabe sind im Durchschnitt 70 - 80% der Ausgangshöhe wieder erreicht. Anschließend kommt es zu einem sehr charakteristischen und konstanten "Überschußeffect", d.h. die Höhe der Ausgangsamplitude wird nach etwa 10 Min. überschritten. Nach 15 - 20 Min. werden allgemein Werte von 108-129% gemessen. Nach 40 Min. ist die Verkürzung bei der Kontraktur wieder auf 91-100% zurückgegangen (Abb.2 und 3). Auch nach längerer Beobachtungszeit ändert sich daran nicht mehr viel.

Die Fähigkeit des Muskels, eine Kontraktur über eine größere Zeitspanne beizubehalten, die, wie beschrieben, unter Calciummangel ebenfalls verlorengeht, wird wenige Minuten nach Calciumzugabe vollständig wiedergewonnen. Wir haben versucht, diesen Verlauf durch die graphische Darstellung des Quotienten a/b zu beschreiben. a stellt dabei die während der einzelnen Kontraktur maximal entwickelte Verkürzung dar, wogegen b deren Abfall nach 15 sec bedeutet (Abb.3).

B. Untersuchungen am isolierten, denervierten Zwerchfell der Ratte in Kaliummethylsulfat-Lösung

Diese Experimente dienten der Untersuchung des erstmals von Jenkinson und Nicholls an ähnlichen Präparaten beobachteten Phänomens der Acetylcholin- Kontraktur im depolarisierenden Milieu (38).

Nachdem die Acetylcholinempfindlichkeit des Präparates im Vorlauf getestet worden war, wurde der Muskel in depolarisierende Kaliummethylsulfat-Lösung überführt. Auf die Depolarisation reagierte er mit einer maximalen

Kontraktur. (Auch diese ist calciumunabhängig, wie es nach den entsprechenden Untersuchungen am glatten Muskel (15, 19), am Froschskelettmuskel (27, 28) und am Herzmuskel (53) anzunehmen war. Wir sind diesem Problem nicht weiter nachgegangen, konnten aber zeigen, daß nach einer längeren Versuchsperiode, während der der Muskel in calciumfreier, aber sonst normal zusammengesetzter Tyrodelösung mit Acetylcholin gereizt wurde, diese Depolarisationskontraktur nicht mehr auftrat.) 25 - 30 Min. nach dem Badwechsel begannen wir mit der Acetylcholinreizung. In allen Versuchen mußten wir dabei mit Dosen im Bereich von 10^{-4} g/ml arbeiten. Es erweist sich, daß mit geringeren Konzentrationen kein verwertbarer Effekt zu erzielen war. Höhere Dosen steigerten die Antwort nicht mehr wesentlich. Wie auch vor uns schon gefunden wurde (38), stellten wir außerdem fest, daß die Kontraktur nur in einem relativ engen Temperaturbereich zwischen 18° und 22°C optimal auflösbar ist, während die Kontraktion auf direkten elektrischen Reiz ebenso wie die Acetylcholinkontraktur in normalem Milieu genauso gut bei 35°C wie bei Zimmertemperatur zu beobachten ist. Die Sensibilität des depolarisierten Muskels (in calciumhaltigem Bad) für Acetylcholin, die von Präparat zu Präparat recht unterschiedlich ist (siehe auch 38), scheint nicht in derselben Weise von der Denervationsdauer abhängig zu sein wie die des polarisierten Muskels. So waren mit der Standarddosis ACh 10^{-4} g/ml sehr gute Effekte bei 31 Tage denervierten Organen zu erzeugen. In normaler Tyrodelösung hat deren Empfindlichkeit gewöhnlich schon deutlich abgenommen. Die Acetylcholinsensibilität des einzelnen Präparates nahm noch für eine ganze Weile im zeitlichen Abstand von der Depolarisation zu (Abb. 4 und 8). Der nach etwa 30 - 60 Min. auftretende Maximalerfolg war anschließend über längere Zeit beliebig reproduzierbar. Die größte Verkürzung erreichte die einzelne Kontraktur in schnellem Anstieg nach durchschnittlich 15 sec. (abhängig von der erreichten Amplitude zwischen 9 und 23 sec). Die folgende Erschlaffungsphase setzte sich aus zwei Teilen zusammen: Nach durchschnittlich 25 sec (Werte zwischen 17 und 38 sec) fiel die Kontraktur im ersten Teil auf die Hälfte ab, während im zweiten Teil bis zur vollständigen Erschlaffung noch längere Zeit benötigt wurde.

Nach 45 sec war regelmäßig noch ein Kontrakturest von durchschnittlich 20% nachzuweisen. Die Amplitude der Verkürzung bei isotonischer Registrierung wechselte, wie erwähnt, recht stark mit dem Präparat. Sie betrug zwischen 147 und 12% (Mittel 70%) derjenigen, die in der Vorlaufsperiode als Vergleichskontrakturen mit Dosen zwischen 10^{-6} und 5×10^{-7} g/ml erzeugt worden waren. (Zum Vergleich: Bei einer typischen Kontraktur auf Acetylcholinreiz in normaler Badlösung wird der maximale Ausschlag nach etwa 38 sec. erreicht. Nach 45 sec liegt die Verkürzung immer noch bei 98% des Maximums). Die Reaktion

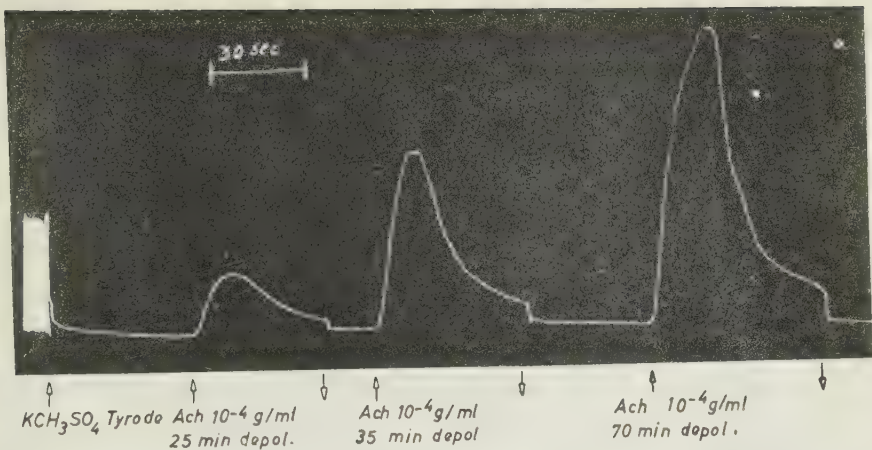


Abb. 4: 31 Tage denervierter Muskel. Nach der Depolarisation gewinnt das Präparat nur allmählich seine größte ACh-Empfindlichkeit. Die eigentliche Depolarisationskontraktur wurde nicht registriert. Nur im polarisierten Zustand kann der Muskel auf einen elektrischen Reiz mit einer Kontraktion antworten (ganz links). Registrierung isotonisch auf Rußkymographion. Umdrehungsgeschwindigkeit des Kymographen im schnellen Gang während eines Reizeffektes 40 mm/min.

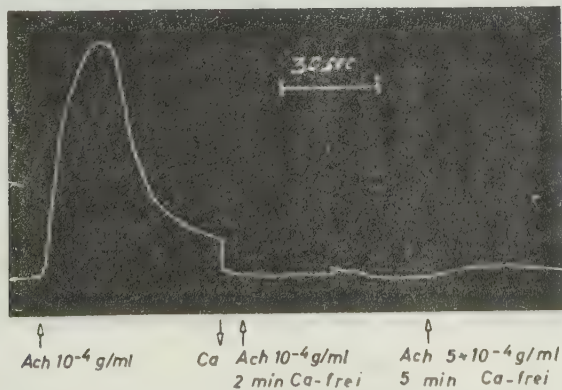


Abb. 5: 31 Tage denervierter und depolarisierter Muskel. Bereits 5 Min. nach Entzug von Calcium ist mit dem 5-fachen der vorher wirksamen Dosis ACh nur noch ein sehr schwacher Effekt zu erzielen. Mit der einfachen Dosis läßt sich schon nach 2 Min. keine deutliche Verkürzung mehr bewirken. Isotonische Registrierung auf Rußkymographion. Umdrehungsgeschwindigkeit des Kymographen 40 mm/min.

Der Muskel befindet sich während des ganzen Versuchs in einer Kaliummethylsulfat enthaltenden, depolarisierenden Badlösung.

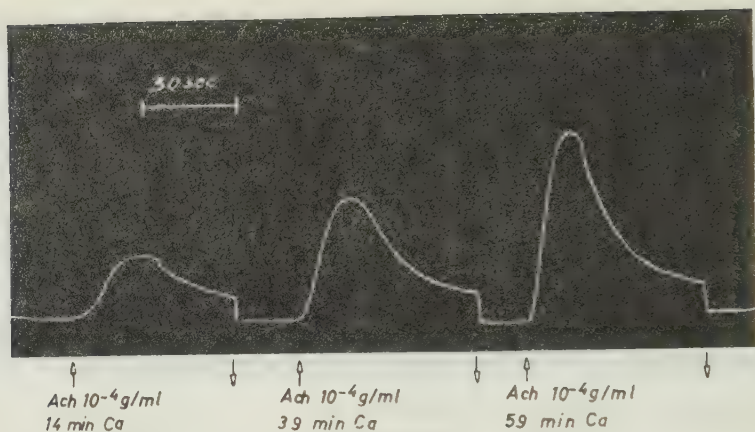


Abb. 6: 31 Tage denervierter und depolarisierter Muskel. Nach einer Periode in calciumfreiem Bad gewinnt das Präparat nicht sofort seine vorherige Empfindlichkeit für ACh zurück.

Isotonische Registrierung auf Rußkymographion. Umdrehungsgeschwindigkeit des Kymographen 40 mm/min.

Der Muskel befindet sich während des ganzen Versuchs in einer Kaliummethylsulfat enthaltenden, depolarisierenden Badlösung.

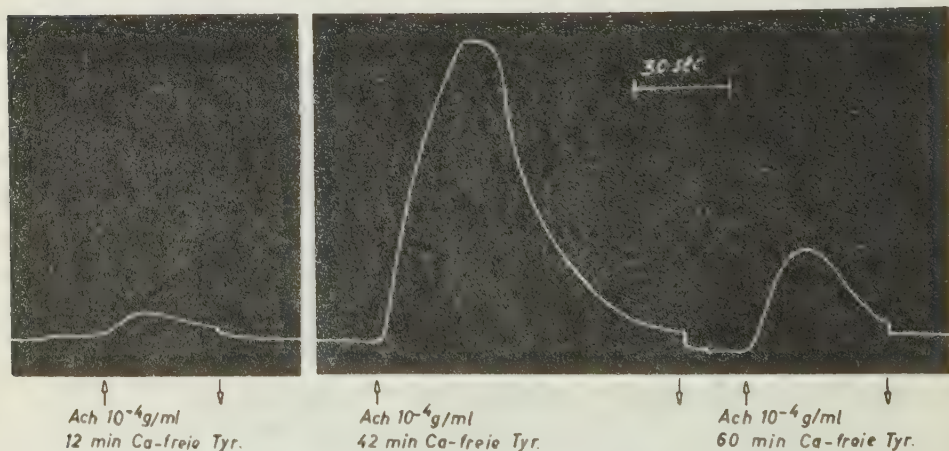


Abb. 7: 29 Tage denervierter Muskel. Nach Wechsel des Organbades von calciumfreier Kaliummethylsulfattyrodelösung in calciumfreie Standardtyrodelösung lassen sich mit ACh wieder Kontrakturen auslösen, obwohl der Calciumgehalt unverändert gering ist. Die Kontrakturen in normalem Milieu sind offenbar gegen Calciummangel weniger empfindlich.

Isotonische Registrierung auf Rußkymographion. Umdrehungsgeschwindigkeit des Kymographen im schnellen Gang während eines Reizeffektes 40 mm/min.

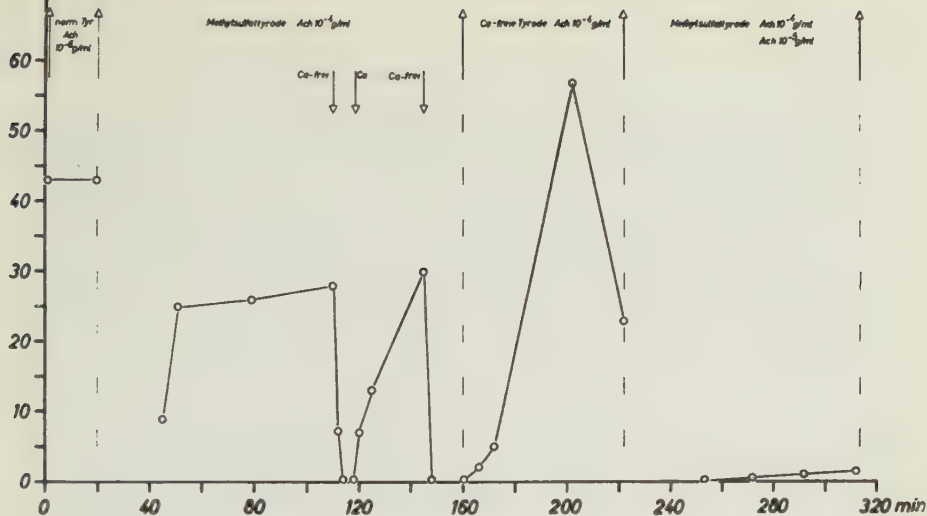


Abb. 8: Unterschiede in der Reaktion des denervierten Muskels auf ACh in polarisierendem und depolarisierendem Milieu. Die Meßpunkte geben die jeweilige absolute Höhe der Kontrakturamplitude wieder. Alle Werte stammen aus demselben Versuch (29 Tage denervierter Muskel). Der typische Kurvenverlauf wird wegen der außerordentlichen Variationsbreite von Präparat zu Präparat auf diese Weise deutlicher als bei der Mittelwertkurve.

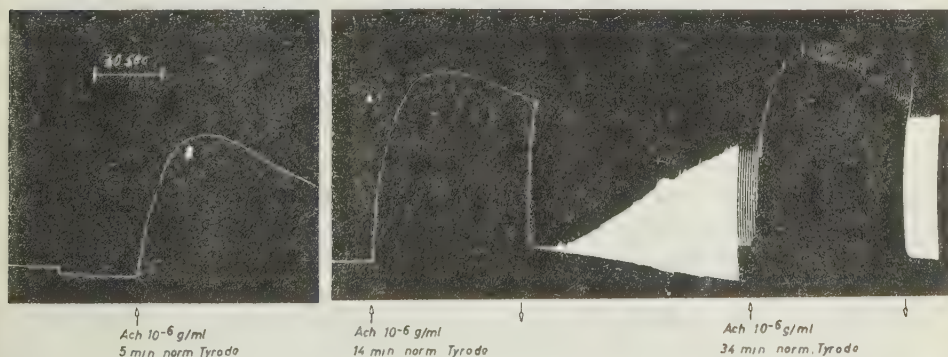


Abb. 9: Nach vorausgegangenem Aufenthalt in calciumhaltiger Kalium-sulfattyrodelösung kam das Präparat in normale Tyrodelösung. Bereits 5 Min. später lassen sich mit ACh wieder Kontraktionen auslösen. Die elektrische Reizung, die während des ganzen Versuchs durchgehend eingeschaltet war, wurde erst nach 18 Min. wieder mit einer Kontraktion beantwortet (Zusammensetzung der K_2SO_4 -Tyrodelösung: 21 g K_2SO_4 statt NaCl, sonst wie Standardlösung). Registrierung isotonisch auf Rußkymographion. Umdrehungsgeschwindigkeit im schnellen Gang während eines Reizeffektes (Kontraktur) 40 mm/min. Frequenz der elektrischen Reizung $\approx$ 1 Hz Maximalreizstärke.



des depolarisierten Muskels auf Acetylcholin ist nur in calciumhaltigem Milieu möglich. 3 - 5 Min. nach Calciumentzug war sie in keinem Falle mehr auslösbar, während sie in polarisierendem Milieu ja noch sehr lange nachweisbar bleibt (Abb. 5). Diese Verschiedenheit ist nicht durch unterschiedlich erfolgreiche Vorkehrungen zur Erzeugung eines calciumfreien Bades zu erklären. Dem schnellen Erlöschen der Kontraktur steht ein etwas langsamerer Anstieg nach Wechsel in calciumhaltige Kaliummethylsulfattyrodelösung gegenüber (Abb. 6 und 8). In einzelnen Versuchen konnten wir eine völlige, in anderen nur eine teilweise Erholung nach etwa 30 Min. erzielen. Schon nach 2 Min. war aber wieder ein meßbarer Effekt zu sehen.

Verbringt man den Muskel, der sich in calciumfreier KCH_3SO_4 -Tyrodelösung nicht mehr kontrahiert, in eine ebenfalls calciumfreie, aber sonst normal zusammengesetzte Lösung, so gelingt es oft schon nach 5 Min. mit der vorher wirkungslosen Konzentration von 10^{-4}g/ml Acetylcholin wieder einen schwachen Effekt zu erzeugen.

Die Stärke der Antwort nimmt noch eine Weile zu, in unseren Experimenten etwa 40 Min., um dann allmählich wieder zurückzugehen. Mit der Dosis 10^{-4}g/ml Acetylcholin konnten Kontrakturamplituden erzeugt werden, die noch um 42% über der Testkontraktur im Vorlauf (Konz. 10^{-6}g/ml) lagen (Abb. 7 und 8). Die elektrische Erregbarkeit kehrt bei diesem Versuchsablauf allerdings nicht oder nur angedeutet zurück. Wird das so behandelte Präparat, d.h. nach einer Zwischenperiode in calciumfreier, aber sonst normaler Lösung, wieder in calciumhaltige KCH_3SO_4 -Tyrodelösung gebracht, so gelang es in keinem Fall erneut, die charakteristische Antwort auf 10^{-4}g/ml Acetylcholin zu erhalten. Wir konnten nur eine sehr geringe Verkürzung beobachten. (Z.B. wurden in einem Versuch in 21 sec 13% der Amplitude erreicht, die zu Beginn in der ersten Depolarisationsperiode nach dem Vorlauf auslösbar war.) Dazu mußte die Acetylcholinkonzentration auf $5 \times 10^{-4}\text{g/ml}$ erhöht werden. Allerdings hielten diese Kontrakturen lange Zeit an. Nach 38 sec nach Beginn betrug der Rest 90% des Maximums. Diese Antwort änderte sich in einer anschließenden Beobachtung über 100 Min. nicht mehr wesentlich. Man gewinnt den Eindruck, daß hier die erwähnte langsame Komponente der Acetylcholinkontraktur in Erscheinung tritt, während die schnelle verlorengegangen ist.

Wir prüften auch das Verhalten des Muskels beim Übergang von depolarisierender Tyrodelösung (aus technischen Gründen mußte bei diesen Versuchen Kaliumsulfattyrodelösung verwendet werden) zu normaler Nährlösung. Da-

bei zeigte sich neben einer quantitativen auch eine zeitliche Dissoziation zwischen dem Wiederauftreten der Acetylcholin- und der Kontraktionen (Abb.9). Diese Beobachtung läßt sich zu den Angaben von Jenerik und Gerard (37) in Beziehung setzen. Die beiden Autoren stellten fest, daß der Muskel bei einem bestimmten niedrigen Membranpotential auf einen elektrischen Reiz keine Kontraktionen mehr, sondern nur noch Kontrakturen ausführen kann.

C. Calciumbestimmungen

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, untersuchten wir vergleichend den Calciumgehalt bei denervierten und normalen Rattenzwerchfellen. Die Muskeln wurden einer wechselnden, in der Tabelle jeweils angegebenen Vorbehandlung unterworfen. Diese Badvorbehandlung wurde so gewählt, daß die Ergebnisse mit denen der Mechanogramme in Beziehung gesetzt werden konnten. So ergab sich die Zeitspanne von 3 Stunden für den Aufenthalt in den verschiedenen Badflüssigkeiten als Vergleichsbasis. Denn nach der gleichen Zeit etwa können die Präparate auf direkten elektrischen Reiz nicht mehr mit einer Kontraktion antworten. Da depolarisierte Muskeln ohne Calcium nach kurzer Zeit nicht mehr mechanisch auf Acetylcholin reagieren, wurde untersucht, ob sich eine ähnlich kurze Zeit schon auf den meßbaren Calciumgehalt auswirkt.

Aus den mitgeteilten Werten ergeben sich folgende Feststellungen:

1. Gegenüber unbehandelten Muskeln führt längere Denervierung zu einem Ansteigen des Calciumgehaltes (die Differenz der Mittelwerte ist signifikant).
2. Nach dreistündigem Bad in normaler Tyrodelösung enthalten denervierte wie nicht denervierte Muskeln etwa die gleiche Menge Calcium. Dabei haben die innervierten Calcium aufgenommen, während die Calciumaufnahme der 36 Tage denervierten nicht sicher signifikant ist. Sie enthalten von vornherein mehr Calcium. Die weniger lang denervierten (15 Tage) nehmen dagegen ebenfalls Calcium auf.
3. Im Vergleich zu ebenso langem Aufenthalt in normaler Tyrodelösung verlieren die denervierten Präparate in calciumfreier Tyrodelösung mehr Calcium als die unbehandelten.
4. Dreistündiger Aufenthalt in Kaliummethylsulfattyrodelösung verursacht weder bei denervierten noch bei innervierten Muskeln deutliche Änderungen im Calciumgehalt gegenüber dem Bad in normaler Tyrodelösung.
5. Kurze Behandlung des depolarisierten Muskels in calciumfreier KCH_3SO_4 -Tyrodelösung führt in keinem Fall zu einer meßbaren Änderung des Calciumgehaltes.

TABELLE DER CALCIUMWERTE

	I	II	III	IV
Vorbehandlung	nicht denerv. 3 Std.Bad norm.Tyrode	nicht denerv. 3 Std.Bad Ca-freie Tyr.	20-25 Tage denerviert 3 Std.Bad norm.Tyrode	19 Tage denerv. 3 Std.Bad Ca-freie Tyr.
Zahl der Tiere	4	5	4	4
Zahl der messungen = n	15	19	15	15
Calciumgehalt in mÄqu/kg Feuchtgewicht	$5,8 \pm 0,33$	$3,0 \pm 0,20$	$5,3 \pm 0,38$	$1,6 \pm 0,14$
Signifikanz	Vergleich mit IX: $t = 10,744$ $P < 0,001$	Vergleich mit IV: $t = 6,857$ $P < 0,001$	Vergleich mit A: $t = 6,182$ $P < 0,001$ Vergleich mit AI: $t = 3,107$ $P < 0,005$ $> 0,002$	Vergleich mit II: $t = 6,857$ $P < 0,001$

	V	VI	VII	VIII
Vorbehandlung	nicht denerv. 3 Std.Bad KCH_3SO_4 -Tyr.	nicht denerv. 3 Std.Bad KCH_3SO_4 -Tyr. dann 5 Min. Ca-freie KCH_3SO_4 -Tyr.	21 Tge.de- nerv. 3 Std.Bad KCH_3SO_4 -Tyr.	21 Tge.denerv. 3 Std.Bad KCH_3SO_4 -Tyr. dann 5 min. Ca-freie KCH_3SO_4 -Tyr.
Zahl der Tiere	4	4	4	4
Zahl der Mes- sungen = n	15	15	15	15
Calciumgehalt in mÄqu/kg Feuchtgewicht	$7,2 \pm 1,52$	$5,6 \pm 0,49$	$5,5 \pm 0,44$	$5,6 \pm 0,30$

	IX	X	XI
Vorbehandlung	nicht denerviert frisch entnommen keine Badvorbe- handlung	15 Tage denerviert frisch entnommen keine Badvorbe- handlung	36 Tage denerviert frisch entnommen keine Badvorbe- handlung
Zahl der Tiere	9	5	5
Zahl der Messungen = n	28	15	13
Calciumgehalt in mg/kg Feuchtgewicht	$3,2 \pm 0,18$	$3,6 \pm 0,08$	$4,2 \pm 0,32$
Signifikanz	Vergleich mit I: $t = 10,744$ $P < 0,001$ Vergleich mit X: $t = 2,614$ $P < 0,02$ $> 0,01$ Vergleich mit XI: $t = 4,310$ $P < 0,001$	Vergleich mit IX: $t = 2,614$ $P < 0,02$ $> 0,01$ Vergleich mit XI: $t = 2,622$ $P < 0,02$ $> 0,01$ Vergleich mit III: $t = 6,182$ $P < 0,001$	Vergleich mit X: $t = 2,022$ $P < 0,02$ $> 0,01$ Vergleich mit IX: $t = 4,310$ $P < 0,001$ Vergleich mit III: $t = 3,107$ $P < 0,005$ $> 0,002$

Zur Prüfung der statistischen Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte verwendeten wir den Student-Test (t-Test).

Dazu wurde zunächst der Mittelwert und die mittlere Abweichung des Mittelwertes nach folgenden Formeln errechnet:

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

$$\sum x^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}$$

$$s^2 = \frac{\sum x^2}{n - 1}$$

$$s = \sqrt{s^2}$$

$$s_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Dabei gilt:

X = Einzelwert

n = Anzahl der Werte

x = Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert

$\bar{X}$ = Mittelwert

$s_{\bar{X}}$ = Standardabweichung der Mittelwerte

s = Standardabweichung der Einzelwerte

$$\bar{X} \pm s_{\bar{X}} = \text{Mittelwert} \pm \text{mittlere Abweichung des Mittelwertes}$$

Zum Vergleich der so gewonnenen Mittelwerte wurde t auf folgende Weise berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{s_{\bar{X}_1}^2 \cdot (n_1 - 1) + s_{\bar{X}_2}^2 \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$\bar{X} \text{ diff.} = \bar{X}_1 - \bar{X}_2$$

$$t = \frac{X \text{ diff.}}{\sigma}$$

Aus der t-Tabelle werden die Werte für P (Freiheitsgrade $n_1 + n_2 - 2$) abgelesen.

Es gilt: $P > 0,05$ nicht signifikant
 $P < 0,05 > 0,02$ wahrsch.signifik.
 $P < 0,02$ signifikant
 $P < 0,001$ hoch signifikant

Die Werte für t und P sind in den vorstehenden Tabellen angegeben.

BESPRECHUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE

1. Mechanogramme

Die Befunde, die wir unter den geschilderten Bedingungen an Mechanogrammen denervierter Rattenzwerchfelle erhalten konnten, stimmen mit den Ergebnissen anderer Untersucher bei ähnlichen Fragestellungen recht gut überein. Vor allem konnten wir wie Jenkinson und Nicholls (38) sowie Edman und Grieve (18) unter anderem zeigen, daß eine ganze Reihe von Resultaten zum Kontraktions- und Kontrakturverhalten, die zunächst an Kaltblütermuskeln oder an glatten Muskeln von Säugetieren gewonnen worden waren, auch für den Skelettmuskel des Säugers gültig sind. Eine von den bisherigen Auffassungen wesentlich abweichende Deutung erscheint nicht berechtigt.

Wir müssen davon ausgehen, daß sowohl Acetylcholin wie der elektrische Strom einen Prozeß an der Membran in Gang setzen, der die Calciumionen zur Verfügung stellt, die zur Aktivierung des kontraktile Systems erforderlich sind. Diese Vorgänge an der Membran sind in beiden Fällen nicht völlig identisch, wahrscheinlich spielt aber die Depolarisation, die Erhöhung der Membranpermeabilität für K, Na und eine Reihe anderer anorganischer Ionen, eine hervorragende Rolle (1, 12, 14, 22, 38, 40, 43). Sie ermöglicht auch den erhöhten Calciumeinstrom in den Muskel, der sich sowohl bei der normalen Kontraktion wie bei der Acetylcholin- und Kontraktur (und allen anderen nicht-toxischen Kontrakturen) nachweisen läßt (3, 4, 38, 54, 57, 62, 67). Ein An-elektrotonus, also eine Zwangspolarisation, kann beide Formen der Muskelverkürzung momentan unterdrücken oder verhindern (25, 26, 43, 44, 60). Ähnlich wirkt sich das Fehlen von Calcium in der Badflüssigkeit aus. Es ist das aber kein momentaner Effekt, sondern bewirkt ein allmähliches Erlöschen der Funktion. Der Muskel scheint also über gewisse Calciumreserven zu verfügen, die noch eine Zeitlang das von außen zugeführte zum Teil ersetzen können. Dabei fällt auf, daß die elektrische Erregbarkeit schneller verloren geht als die Fähigkeit zur Acetylcholin- und Kontraktur. Dieselbe Beobachtung ist von Edman und Grieve gemacht worden (18). Die tatsächliche Dauer dieses Prozesses hängt weitgehend ab von dem verwendeten Präparat (besonders seiner Größe und Dicke), der Versuchsanordnung (z.B. Reizfrequenz) und dem Grad der im Milieu wirklich erreichten Calciumarmut (siehe auch 57). Bei den Untersuchungen von Edman und Grieve (18), ebenfalls am Rattenzwerchfell, vergingen etwa drei Stunden bis zum Aufhören der elektrischen Erregbarkeit. Das entspricht auch unseren Beobachtungen. Für die Acetylcholin- und Kontraktur schwanken die Angaben zwischen einer Stunde (Frank, ext. digit. IV

des Frosches) und 3 - 4 Stunden (Edman und Grieve, Rattenzwerchfell) (18, 29). Wir fanden im Mittel 3 Stunden. Nach dieser Zeit waren unsere Präparate aber noch nicht absolut refraktär gegenüber dem Acetylcholinreiz, sondern nur gegenüber der vorher gewählten Dosis. Solche Zeitdifferenzen haben aus den genannten Gründen nur beschränkten Aussagewert. Der Zusammenhang zwischen Organgröße und Dauer der Erregbarkeit in calciumfreiem Bad läßt darauf schließen, daß Calcium um so schneller durch Diffusion verlorengeht, je kleiner das Präparat ist. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, daß Calcium auch aus Depots an oder in der Membran immer freigesetzt wird, wenn irgendwelche Mittel eine Depolarisation bewirken (55). Ob man für Acetylcholin einen zusätzlichen Mechanismus annehmen muß, wird weiter unten noch diskutiert.

Es bleibt die Frage offen, warum denn der Muskel, auch wenn er elektrisch nicht mehr reizbar ist, noch auf eine Applikation von Acetylcholin mit einer Kontraktur antworten kann. Die Kontraktion beruht auf der Entstehung und Fortleitung eines Aktionspotentials (siehe auch 60). Mit dem allmählichen Sinken des Calciumspiegels wird aber das Aktionspotential nicht mehr ungedämpft fortgeleitet, sondern es verliert sich entlang der Muskelfaser. So liegt die Abnahme der Kontraktionsleistung wahrscheinlich an einer ungenügenden Aktivierung der kontraktile Elemente (17). Parallel dazu geht auch das lokale Aktionspotential zurück und sinkt das Ruhepotential (8, 9, 16, 36, 37, 42, 61 u.a.). Die tieferen Ursachen dieser Vorgänge sind ungeklärt. Jedenfalls ist die Anwesenheit von Calciumionen an sich nicht erforderlich, um ein Aktionspotential zu erzeugen (42).

Der Acetylcholineffekt ist unabhängig vom Prozeß der elektrischen Erregung (12, 22, 9). Er beruht außerdem auf der gleichzeitigen und längerdauernden Depolarisation vieler Fasern, die von dem niedrigeren Ruhepotential weniger beeinflusst wird (47). (Siehe auch Jenerik und Gerard (37): Wird das Ruhepotential bis zu einem kritischen Wert gesenkt, so läßt sich mit einem elektrischen Reiz nicht mehr eine Kontraktion, sondern nur noch eine Kontraktur auslösen. Auch Abb. 9 gehört in diesen Zusammenhang.) Es ist denkbar, daß auf diesem Wege eine vermehrte Freisetzung gebundenen Calciums aus Depots möglich ist. Damit sind auch die zeitlichen und quantitativen Differenzen zwischen der elektrischen Kontraktion und der Kontraktur nach Ca-Entzug bzw. anschließender Ca-Zugabe begründbar. Es gibt nun einige Hinweise auf eine noch über den Depolarisationseffekt hinausgehende Wirkung des Acetylcholins. Denn einmal gelang es sowohl am Skelett- wie am glatten Muskel, eine gewisse Dissoziation zwischen reiner Depolarisationskon-

traktur (Kaliumkontraktur) und Acetylcholinkontraktur zu zeigen. So fanden Edman und Schild (19) am Rattenuterus in calciumfreiem Bad Acetylcholin länger kontrakturwirksam als die reine K-Depolarisation. Frank (29) konnte unter ähnlichen Bedingungen am Froschskelettmuskel noch kontraktile Antworten auf Acetylcholin sehen, wenn die Kaliumchloridkontraktur schon nicht mehr auszulösen war. In dieselbe Richtung weist eine eigene Beobachtung: Die Depolarisationskontraktur mit Kaliummethylsulfatylöserelösung wird unter Calciummangel früher vermißt als der Acetylcholineffekt. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß Acetylcholin noch zusätzlich gebundenes Calcium freisetzen kann (19, 29, 34).

Zum anderen gelang uns ebenso wie vorher Jenkinson und Nicholls (38) sowie Edman und Grieve (18) der Nachweis von Acetylcholinkontrakturen beim depolarisierten Säugerskelettmuskel, der sich auf elektrischen Reiz nicht mehr kontrahiert. Am glatten Muskel sind gleiche Befunde schon länger bekannt (14, 20, 21, 63). Es scheint hier eine Potenz des Acetylcholins zum Vorschein zu kommen, die in normalen Badlösungen von der begleitenden Depolarisation überdeckt wird. Frank (29) hält auf Grund seiner abweichenden Ergebnisse am Skelettmuskel des Frosches solch eine zusätzliche Acetylcholinwirkung nur in strenger Koppelung mit der Depolarisation für möglich. Es ist aber denkbar, daß diese Befunde nur wegen besonderer Versuchsbedingungen erhalten wurden.

Über den genauen Angriffspunkt des Acetylcholins, der diesen besonderen Effekt gestattet, sind bis jetzt nur Vermutungen möglich. Folgende Deutungen werden diskutiert:

1. Acetylcholin wirkt in depolarisierendem Milieu direkt auf die kontraktile Elemente.
2. Acetylcholin setzt Calcium aus Depots frei, die von anderen Formen der Depolarisation nicht betroffen werden.
3. Acetylcholin erhöht den Calciumeinstrom in die Muskelzelle über eine Steigerung der Membranpermeabilität und die Aktivierung bestimmter Transportmechanismen, unabhängig vom Polarisationszustand der Membran.

Für die erste Möglichkeit spricht nichts, dagegen über die starke Calciumabhängigkeit der Kontraktur und ihre reversible Hemmung durch Curare (18, 38). Für die zweite Möglichkeit lassen sich einige Befunde am glatten Muskel anführen. Edman und Schild (19) fanden nämlich, daß sich der depolarisierte Rattenuterus in calciumfreiem Bad auf Acetylcholinreiz noch über 100 Min. lang kontrahieren kann. Dabei waren keine höheren Dosen als in

normaler Nährlösung erforderlich. Es zeigte sich außerdem, daß die Kontraktur sich um so schneller erschöpft, je häufiger gereizt wird, unabhängig davon, ob die Muskelzellmembran polarisiert ist oder nicht. Für den Skelettmuskel der Ratt trifft aber 2. mit großer Wahrscheinlichkeit nicht zu. Beim Zwerchfellpräparat verschwindet die Acetylcholincontraktur des depolarisierten Muskels praktisch sofort nach Calciumentzug. Einigermaßen befriedigend läßt sich nur das mit der angeführten dritten Deutungsmöglichkeit erklären (im Anschluß an Jenkinson und Nicholls). Sie ist auch experimentell am besten gestützt. Es liegen Befunde sowohl für den Skelett- wie für den glatten Muskel vor, die zeigen, daß die der depolarisierenden Wirkung von Acetylcholin zugrunde liegende Leitfähigkeitssteigerung auch eintritt, wenn die Membran bereits depolarisiert ist und eine Erhöhung der Calciumaufnahme (Nettoaufnahme) stattfindet. Eine Vergrößerung der K^+ - und Na^+ -Permeabilität ist damit gekoppelt (14, 12, 38, 40, 57).

Die eigenartige Acetylcholincontraktur des depolarisierten Skelettmuskels hat übrigens auch eine, wenigstens aspektmäßige Entsprechung beim glatten Muskel. Am depolarisierten Rattenuterus in calciumfreiem Bad vermag eine Calciumapplikation allein eine Verkürzung zu bewirken. Bei zusätzlicher Acetylcholingabe entwickelt der Muskel weitere Spannung. Es zeigt sich eine praktisch vollständige Addition der einzeln auslösbaren Effekte (19). Die Interpretation liegt nahe, daß Acetylcholin am depolarisierten glatten Muskel gebundenes Calcium freisetzen kann, während die Verkürzung des Skelettmuskels nur, wie die Calciumcontraktur des Rattenuterus, auf erhöhtem Calciumeinstrom beruht.

Die entscheidende Frage, warum denn Acetylcholin bei depolarisierter Membran die Calciumdepots nicht zu aktivieren vermag, bleibt allerdings noch zu klären. Daß noch ein Vorrat mobilisierbaren Calciums vorhanden ist, kann angenommen werden, weil, wie wir zeigen konnten, nach Erlöschen der Acetylcholincontraktur in calciumfreier Kaliummethylsulfat Tyrodelösung, sie in calciumfreier Normal Tyrodelösung noch zu sehen ist. Wenn die Calciumdepots für die Acetylcholincontraktur in KCH_2SO_4 -Tyrodelösung tatsächlich keine Rolle spielen, müßte man aber erwarten, daß sich der Muskel in calciumhaltiger, depolarisierender Lösung auf Acetylcholin noch kontrahiert, wenn er vorher in calciumfreier Tyrodelösung seine Reizbarkeit weitgehend verloren hat. Es ist uns im Gegensatz zu Edman und Grieve (18) nicht gelungen das nachzuweisen. Möglicherweise bestehen also doch Beziehungen zwischen dem "Füllungszustand" der Depots und dem Calciumaustausch durch die Membran.

Auch für einige andere Eigenarten dieser besonderen Kontraktur ist bis jetzt noch keine bedriedigende Deutung gelungen. Das betrifft die Temperaturabhängigkeit und die Variabilität der Kontrakturnamplitude bei verschiedenen Präparaten des gleichen Muskels mehrerer Tiere (siehe auch 38). Es gilt ebenso für die Beobachtung, daß die Kontraktur zwar bei Calciumentzug sofort verschwindet, nach anschließendem Calciumzusatz aber erst allmählich zurückkehrt. Unklar ist weiterhin, warum nach Depolarisation nicht sogleich die maximale Verkürzung bei Acetylcholingabe möglich ist, sondern die Reaktion noch eine Weile im zeitlichen Abstand von der Depolarisation zunimmt. Endlich hat man auch keine Erklärung für die unterschiedliche Form der Verkürzungs- bzw. Spannungsentwicklung der Acetylcholincontrakturen in normalem und in depolarisierendem Milieu.

Am Muskel in indifferenter Nährlösung konnten wir über die besprochenen Feststellungen hinaus noch beobachten, daß die Dauer der Einzelkontraktur in calciumarmem Milieu abnimmt. Das unterstreicht wohl die bekannte Tatsache, daß Calcium nicht nur als Initialzündler der Verkürzung wirkt, sondern auch zu ihrer Unterhaltung benötigt wird, d.h. dauernd einströmen muß (3, 4, 52, 66, 67 u.a.). Ein Vergleich mit dem Verhalten der Kaliumkontraktur tonischer Froschmuskeln liegt nahe (vgl. z.B. 13). Es fällt auf, daß der Quotient, der die Geschwindigkeit beschreibt, mit der die Einzelkontraktur zurückgeht, bei ausreichendem Calciumangebot nach längerem Aufenthalt in calciumfreier Lösung, die erste Größe ist, die den Ausgangswert wieder erreicht (Abb.3).

2. Calciumbestimmungen

Wir haben schon erwähnt, daß sich mit einer Gesamtcalciumbestimmung die minimalen Calciumverschiebungen, die eine Reizung und Kontraktion der Muskelzelle begleiten, nicht erfassen lassen. So treten auf den Mechanogrammen auffallende Änderungen des Kontraktur- und Kontraktionsverhaltens im meßbaren Calciumgesamtgehalt nicht in Erscheinung. Die Beurteilung wird noch erschwert durch erhebliche Schwankungen der Werte von Tier zu Tier. Trotzdem halten wir einige Folgerungen aus unseren Ergebnissen für wesentlich.

Auch am Rattenzwerchfell ließ sich zeigen, daß ein großer Teil des Muskelcalciums in gebundener Form vorliegt. Die unbehandelten Präparate erfuhren in calciumfreier Nährlösung gegenüber den frisch entnommenen keine signifikante Abnahme ihres Calciumgehaltes. Bei denervierten Zwerchfellen war der Verlust dagegen erheblich. Der Anteil des leicht mobilisierbaren Cal-

ciums scheint zugenommen zu haben. Unsere Calciumwerte vom frischen normalen Muskel stimmen dabei mit den aus der Literatur im Handbuch der experimentellen Pharmakologie (Bd.17) zusammengestellten Angaben überein. Neuere Untersuchungen über die austauschbare Calciumfraktion sind vorwiegend am Froschmuskel durchgeführt worden. Der absolute Calciumgehalt frisch entnommener unbehandelter Kontrollpräparate variiert auch beim Frisch außerordentlich (2, 30, 32). Er liegt aber in derselben Größenordnung wie bei der Ratte.

Harris (32) fand nun, daß sich nur etwa 15-20% des Gesamtcalciums durch Ca^{45} ersetzen lassen. Die Präparate von Gilbert und Fenn (30) verloren nach 5 Stunden in calciumfreier Nährlösung etwa 25% ihres Calciumgehaltes.

Eine weitere Folge der Denervation, neben der Vergrößerung des Anteils an frei diffusiblem Calcium, scheint die wahrscheinlich signifikante Zunahme des Gesamtgehaltes frisch entnommener Muskeln zu sein. Der Einfluß der Denervierung auf den Calciumgehalt ist schon von Hines und Knowlton (1937) am M.gastrocnemius der Ratte untersucht worden (35). Bei einer ganzen Reihe von Maßnahmen (Denervation, Tendotomie z.B.), die eine Atrophie des Muskels nach sich ziehen, fanden sie eine Zunahme des Calciumgehaltes gegenüber dem unbehandelten Muskel am anderen Bein.

Wir konnten auch wahrscheinlich machen, daß die Depolarisation der Membran mit KCH_3SO_4 -Tyrodelösung keinen Einfluß auf den Calciumgehalt hat, der über den normaler Badflüssigkeit hinausgeht. Es ist auch in indifferenten wie in depolarisierter Lösung ein Anstieg des muskulären Calciums bemerkenswert (siehe auch 2).

Energetische Betrachtungen lassen Gilbert und Fenn eine "Calciumpumpe" annehmen, die eine niedrige intracelluläre Calciumkonzentration aufrecht erhält. Der Anstieg bei Muskelveränderungen im Sinne einer Atrophie (35) oder nach stundenlanger Reizung (31, 48) wird als Schädigung dieses "Pump-mechanismus" gedeutet.

Der hohe Calciumgehalt, der sich unabhängig von der Denervation und vom Polarisationszustand der Membran nach längerem Aufenthalt in Badlösungen mit normaler Calciumkonzentration einstellt, legt noch einige andere Überlegungen nahe. Wir müssen annehmen, daß besonders der intracelluläre und membrangebundene Anteil erhöht ist. Die extracelluläre Konzentration steht mit der Badkonzentration im Gleichgewicht. Dabei scheint diese Erhöhung im wesentlichen die in gebundener, nicht ionisierter Form vorliegende Cal-

ciumfraktion zu betreffen. Nähme auch der ionisierte, aktive Teil des Zellcalciums zu, so müßte das wirksame Konzentrationsgefälle abnehmen. Es wäre dann auch ein weitgehender Verlust der Acetylcholinwirksamkeit zu erwarten, die ja zum größten Teil auf der Permeabilitätsänderung der Membran beruht. Einen Hinweis auf den Einfluß des Konzentrationsgefälles gibt wohl auch die Beobachtung der überschießenden Reaktion des Muskels auf Acetylcholin nach einer Periode der Reizung in calciumfreier Lösung (und anschließender Calciumzugabe). Im Einklang damit steht die bekannte Tatsache, daß in einem bestimmten Bereich die Calciumkonzentration mit der entwickelten Zuckungshöhe bzw. Spannung parallel geht (4, 51, 61, 67).

ZUSAMMENFASSUNG

In normaler und depolarisierender Tyrodelösung (KCH_3SO_4 -Tyrode) wurden Präparate isolierter, chronisch denervierter Rattenzwerchfelle mit Acetylcholin (ACh) und elektrischem Strom gereizt. Wir untersuchten das Verhalten der Kontraktionen und der ACh-Kontrakturen in calciumhaltiger und calciumfreier Badlösung. Dabei fand sich:

1. Sowohl Kontraktionen wie ACh-Kontrakturen sind noch eine Zeitlang in calciumfreier Lösung möglich. Kontrakturen können länger ausgelöst werden als Kontraktionen.
2. Die Restitution sowohl der Kontraktionen wie der Kontrakturen in normaler Tyrodelösung (nach Ca-freiem Bad) benötigt viel weniger Zeit als der Verlust der beiden Verkürzungsarten in calciumfreiem Medium. Die Kontrakturen kehren dabei schneller und vollständiger zurück als die Kontraktionen, die die alte Amplitude nicht wieder erreichen.
3. In depolarisierendem Medium können mit großen Dosen ACh (10^{-4}g/ml Bad) noch Kontrakturen ausgelöst werden, die unter Calciummangel schon nach 2-3 Min. nicht mehr auftreten. Präparate, die sich in calciumfreier KCH_3SO_4 -Tyrodelösung auf ACh nicht mehr verkürzten, waren dazu in calciumfreier normaler Tyrodelösung noch in der Lage.

Zur Deutung wurde darauf hingewiesen, daß ACh auch am depolarisierten Muskel eine Permeabilitätssteigerung der Membran für anorganische Ionen, darunter Ca^{++} , bewirken kann (38 u.a.). Dagegen ist es am depolarisierten Präparat möglicherweise nicht in der Lage, gebundenes Calcium aus Depots freizusetzen, wie das am polarisierten Muskel wahrscheinlich ist.

Außerdem wurde der Calciumgehalt von denervierten und nicht denervierten Rattenzwerchfellen nach unterschiedlicher Vorbehandlung bestimmt und verglichen. Es ergab sich im wesentlichen:

1. Der Calciumgehalt länger (36 Tage) denervierter Muskeln nimmt gegenüber unbehandelten zu.
2. Denervierte Muskeln geben in calciumfreiem Medium mehr Ca ab als unbehandelte.
3. Aufenthalt in Kaliummethylsulfattyrodelösung verursacht weder bei denervierten noch bei innervierten Präparaten deutliche Veränderungen des Calciumgehaltes gegenüber dem Bad in normaler Tyrodelösung.

LITERATUR

1. Axelsson, J. and S. Thesleff
A study of supersensitivity in denervated mammalian skeletal muscle.
J. Physiol. 147, 178 (1959)
2. Berwick, M. C.
The effect of anesthetics on calcium release.
J. Cell. Comp. Physiol. 38, 95 (1951)
3. Bianchi, C. P.
Calcium movements in muscle.
Circulation 24, 518 (1961)
4. Bianchi, C. P. and A. M. Shanes
Calcium influx in skeletal muscle of rest, during activity and during potassium contracture.
J. Gen. Physiol. 42, 803 (1959)
5. Bouckaert, J. P. et I. Belehradek
Influence de la concentration des ions Ca, Na et K sur la contraction musculaire.
Arch. int. Physiol. 29, 71 (1927)
6. Brecht, K., K. Barbey, W. Kutscha und P. Pauschinger
Tetanus und Kontraktur bei der Verkürzung quergestreifter schneller und langsamer Muskeln in isotonischer KCl-Lösung und ihre Abhängigkeit von der Ca-Konzentration.
Pflüg. Arch. ges. Physiol. 273, 130 (1961)
7. Bülbring, E.
Observations of the isolated phrenic-nerve diaphragm preparation of the rat.
Brit. J. Pharmacol. 1, 38 (1946)
8. Bülbring, E., M. Holman and L. Lüllmann
Effects of calcium deficiency on striated muscle of the frog.
J. Physiol. 133, 101 (1956)
9. Burnstock, G. and R. W. Straub
A method for studying the effects of ions and drugs on the resting and action potentials in smooth muscle with external electrodes.
J. Physiol. 140, 156 (1958)
10. Chao, I.
Action of electrolytes on electrical stimulation of skeletal muscle.
J. Cell. Comp. Physiol. 6, 1 (1935)
11. Creese, R. and H. E. Roberts
J. Physiol. 127 32 P (1955)

12. Del Castillo, J. and B. Katz
Local activity at a depolarized nerve-muscle junction.
J. Physiol. 128, 396 (1955)
13. Denton, E. I.
The role of calcium in the contractions of the rectus abdominis of the frog.
J. Physiol. 107, 32 P (1948)
14. Durbin, R. P. and D. H. Jenkinson
The effect of carbachol on the permeability of depolarized smooth muscle to inorganic ions.
J. Physiol. 157 74 (1961)
15. Durbin, R. P. and D. H. Jenkinson
The calcium dependence of tension development in depolarized smooth muscle.
J. Physiol. 157, 90 (1961)
16. Edman, K. A. P. and D. W. Grieve
The role of calcium and zinc in the electrical and mechanical responses of frog sartorius muscle.
Experientia 17, 557 (1961)
17. Edman, K. A. P. and D. W. Grieve
The decremental propagation of the action potential and loss of mechanical response in frog sartorius muscle in the absence of calcium.
Experientia 19, 40 (1963)
18. Edman, K. A. P. and D. W. Grieve
A calcium dependent link beyond the electrical excitation of the membrane in muscular contraction.
Experientia 19, 40 (1963)
19. Edman, K. A. P. and H. O. Schild
The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus.
J. Physiol. 161, 424 (1962)
20. Evans, D. H. L. , H. O. Schild and S. Thesleff
Effects of drugs on depolarized plain muscle.
J. Physiol. 143, 474 (1958)
21. Evans, D. H. L. and H. O. Schild
Mechanism of contraction of smooth muscle by drugs.
Nature 180, 341 (1957)

22. Fatt, P. and B.Katz
An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode.
J.Physiol. 115, 320 (1951)
23. Fatt, P. and B.Katz
The effect of sodium ions on neuromuscular transmission.
J.Physiol. 118, 73 (1952)
24. Fenn, W.O., J.F.Manery and W.R.Bloor
Electrolyte changes in cat muscle during stimulation.
Amer.J.Physiol. 121, 595, (1938), zit.n. Hdb.d.exp.Pharm.Bd.17, 1
Berlin: Springer 1963
25. Fleckenstein, A., H.Hille und W.E.Adam
Aufhebung der Kontrakturwirkung depolarisierender Kathelektrotonika durch
Repolarisation im Anelektrotonus.
Pflüg. Arch.ges.Physiol. 253, 264 (1951)
26. Fleckenstein, A. und F.Richter
Weitere Untersuchungen über die Aufhebung der Kontrakturwirkung von
ACh, Cholin, Neurin, Nicotin, Coniin, Veratrin, Kaliumchlorid und Rubi-
diumchlorid durch Anelektrotonus.
Pflüg. Arch.ges.Physiol. 257, 1 (1953)
27. Frank, G.B.
Inward movement of calcium as a link between electrical and mechanical
events in contraction.
Nature 182, 1800 (1958)
28. Frank, G.B.
Effect of changes in extracellular calcium concentration on the potassium
induced contracture of frog's skeletal muscle.
J.Physiol. 151, 518 (1960)
29. Frank, G.B.
Utilisation of bound calcium in the acetylcholine contracture of frog ske-
letal muscle.
J.Pharmacol. 139, 261 (1963)
30. Gilbert, D.L. and W.O.Fenn
Calcium equilibrium in muscle.
J.Gen.Physiol. 40, 393 (1957)
31. Gillis, J. et G.Maréchal
Les déplacements ioniques au cours de la fatigue musculaire.
Arch.int.Physiol. 68, 5 24 (1960)

32. Harris, E.J.
The output of ^{45}Ca from frog muscle.
Biochim.biophys.acta 23, 80 (1957)
33. Heilbrunn, L.V. and F.Y. Wiercinsky
The action of various cations on muscle protoplasm.
J.Cell.Comp.Physiol. 29, 15 (1947)
34. Heilbrunn, L.V.
An outline of general physiology. (J. Physiol. 161, 424
Philadelphia: W.B.Saunders 1952, zit.n. Edman und Schild (1962)
35. Hines, H.M. and G.C. Knowlton
Electrolyte and water changes in muscle during atrophy.
Amer.J.Physiol. 120 719 (1937)
36. Ishiko, N. and M.Sato
The effect of calcium ions on electrical properties of striated muscle
fibres.
Jap.J.Physiol. 7, 51 (1957)
37. Jenerik, H.P. and R.W. Gerard
Membrane potential and threshold of single muscle fibres.
J.Cell.Comp.Physiol. 42, 79 (1953)
38. Jenkinson, D.H. and J.G. Nicholls
Contractures and permeability changes produced by acetylcholine in
depolarized denervated muscle.
J.Physiol. 159, 111 (1961)
39. Klaus, W.
Eine Mikromethode zur serienmäßigen Calciumbestimmung in kleinen
Gewebsproben.
Klin.Wschr. 40, 1123 (1962)
40. Klaus, W., G.Kuschinsky, H.Lüllmann und E.Muscholl
Über den Einfluß von Acetylcholin auf die Kaliumpermeabilität der de-
nervierten Muskelmembran im polarisierten und depolarisierten Zustand.
Med.exp. 1, 8 (1959)
41. Knowlton, G.C. and H.M.Hines
Acetylcholine contracture of denervated muscle.
Amer.J.Physiol. 120, 757 (1937)
42. Koketsu, K. and K.Noda
Membrane responses of frog skeletal muscle fibres in calcium free media.
J.Cel..Comp.Physiol. 59, 323 (1962)

43. Kuffler, S. W.
The relation of electric potential changes to contracture in skeletal muscle.
J. Neurophysiol. 9, 367 (1946)
44. Kuffler, S. W.
Membrane changes during excitation and inhibition of the contractile mechanism.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 47, 767 (1947), zit. n. Sandow (1955)
Amer. J. Physiol. Med. 34, 145
45. Lüllmann, H.
Das Verhalten normaler und denervierter Skelettmuskulatur in chloridfreiem Medium.
Arch. exp. Path. Pharmac. 240, 351 (1961)
46. Lüllmann, H. und Muscholl, E.
Über die Wirkung hypotoner Salzlösungen auf das Rattenzwerchfell.
Arch. exp. Path. Pharmac. 221, 209 (1954)
47. Lüllmann, H. und W. Pracht
Über den Einfluß von Acetylcholin auf das Membranpotential denervierter Rattenzwerchfelle.
Experientia 13, 288 (1957)
48. Lissak, K. und T. Kovacs
K und Ca-Gehalt der Muskeln und Nerven in den verschiedenen Stadien der neuromuskulären Erregungsübertragung.
Pflüg. Arch. ges. Physiol. 245, 790 (1942)
49. Miledi, R.
The acetylcholine sensitivity of frog muscle fibres after complete or partial denervation.
J. Physiol. 151, 1 (1960)
50. Muscholl, E. und H. Lüllmann
Die Wirkung von Acetylcholin, Dekamethonium und d-Tubocurarin am isolierten Rattenzwerchfell in Abhängigkeit von der Denervationsdauer.
Arch. exp. Path. Pharmac. 226, 88 (1955)
51. Niedergerke, R.
The rate of action of calcium ions on the contraction of the heart.
J. Physiol. 138, 506 (1957)
52. Niedergerke, R.
Local muscular shortening by intracellular applied calcium.
J. Physiol. 128, 12 P (1955)

53. Niedergerke, R.
The potassium chloride contracture of the heart and its modification by calcium.
J. Physiol. 134, 584 (1956)
54. Niedergerke, R.
Calcium and the activation of contraction.
Experientia 15, 128 (1959)
55. Noda, K., K. Koketsu and S. Miyamoto
Release of membrane calcium and membrane depolarisation.
Fed. Proc. 20, 346 (1961)
56. Reid, G. and E. M. Vaughan Williams
The development of sensitivity to acetylcholine in denervated muscle.
J. Physiol. 114, 515 (1951)
57. Robertson, P. A.
Calcium and contractility in depolarised smooth muscle.
Nature 186, 316 (1960)
58. Rosenblueth, A. and I. V. Luco
A study of denervated mammalian skeletal muscle.
Amer. J. Physiol. 120, 781 (1937)
59. Sandow, A.
Excitation-contraction coupling in muscular response.
Yale J. Biol. Med. 25, 176 (1952)
60. Sandow, A.
Contracture responses of skeletal muscles.
Amer. J. Phys. Med. 34, 145 (1955)
61. Shanes, A. M.
Electrochemical aspects of physiological and pharmacological action in excitable cells.
Pharmacol. Rev. 10, 59 (1958)
62. Shanes, A. M. and C. P. Bianchi
Radiocalcium release by stimulated and potassium treated sartorius muscle of the frog.
J. Gen. Physiol. 43, 481 (1960)
63. Singh, I. and Acharya, A. K.
Excitation of unstriated muscle without any ionic gradient across the membrane.
Indian J. Physiol. Pharmacol. 1, 265 (1957), zit. n. Hdb. d. exp. Pharmak.
Bd. 17, 1, Berlin: Springer 1963

64. Taylor, K.E.
The contractile process is not associated with potential changes.
J. Cell. Comp. Physiol. 42, 103 (1953)
65. Weber, A.
Value of models for understanding of muscular contraction.
Amer. J. Phys. Med. 34, 13 (1955)
66. Weidman, S.
Effect of increasing the calcium concentration during a single heart-beat.
Experientia 15, 128 (1959)
67. Winegrad, S.
The possible role of calcium in the excitation-contraction coupling of the heart muscle.
Circulation 24, 523 (1961)
68. Woodward, A. A. Jr.
The release of radioactive Ca^{45} from muscle during contraction.
Biol. Bull. 97, 264 (1949)

Außerdem wurde zur allgemeinen Orientierung herangezogen:

Bacq, Z. M. (Editor)

Ions alcalino-terreux, Handbuch der experimentellen Pharmakologie
Bd. 17, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963

Herrn O . T i l g e r danke ich herzlich für die Mithilfe bei der
Anfertigung der Abbildungen.

LEBENS LAUF

Als Sohn des Univ.Prof. Dr. Walter Porzig und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Müller, wurde ich am 16.2.1940 in Jena/Thür. geboren. Nach dem Besuch der Volksschulen in Jena, Zschernitzsch/Thür., Pfalzfeld/Hunsrück und Biel/Schweiz (Herbst 1945 bis zum Herbst 1949) und dem Besuch des staatl. Neusprachlichen Gymnasiums Simmern/Hunsrück sowie des neusprachlichen Zweiges des staatl. Gutenberg-Gymnasiums Mainz legte ich am 28.2.1958 die Reifeprüfung ab. Im Anschluß an den einjährigen Wehrdienst begann ich zum Sommersemester 1959 mit dem Studium der Medizin in Mainz. Am 29.4.1960 bestand ich dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung. Vom Sommersemester 1960 bis einschließlich Sommersemester 1961 studierte ich an der Universität Tübingen, wo ich am 27.10.1961 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Während der nachfolgenden sechs klinischen Semester war ich ohne Unterbrechung an der Universität Mainz immatrikuliert. Am 1.2.1965 legte ich dort das medizinische Staatsexamen ab.

